

BEST AVAILABLE COPY

PCT/JP2004/005191

09. 4. 2004

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日 2003年 6月12日
Date of Application:

出願番号 特願2003-167792
Application Number:

[ST. 10/C]: [JP2003-167792]

REC'D 03 JUN 2004
WIPO PCT

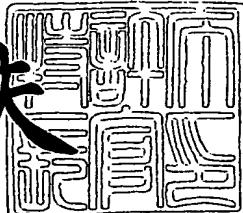
出願人 ローム株式会社
Applicant(s):

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 5月21日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



出証番号 出証特2004-3042669

【書類名】 特許願
【整理番号】 JP030154P
【提出日】 平成15年 6月12日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 G01N 33/00
【発明者】

【住所又は居所】 京都市右京区西院溝崎町21 ローム株式会社内
【氏名】 嶋崎 隆章

【発明者】
【住所又は居所】 京都市右京区西院溝崎町21 ローム株式会社内
【氏名】 横川 昭徳

【特許出願人】
【識別番号】 000116024
【氏名又は名称】 ローム株式会社

【代理人】
【識別番号】 100094145
【弁理士】
【氏名又は名称】 小野 由己男
【連絡先】 06-6316-5533

【選任した代理人】
【識別番号】 100106367
【弁理士】
【氏名又は名称】 稲積 朋子

【手数料の表示】
【予納台帳番号】 020905
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 対象物質の定量方法及び定量チップ

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

三次元網目構造物質で形成され、前記網目に対象物質と反応する試薬が含有されている構造体を用いて前記対象物質を定量する定量方法であって、

前記対象物質を含む試料を前記構造体に接触させる接触ステップと、

前記対象物質と前記試薬との反応により増加又は減少する物質が増加または減少している過程において、前記構造体内における前記増加又は減少する物質を、前記試料と前記構造体との接触界面を基準にして検出する検出ステップと、

前記検出ステップの結果に応じて前記対象物質の定量を行う定量ステップとを含み、

前記構造体の網目は、少なくとも前記対象物質を通過させる、
定量方法。

【請求項 2】

前記構造体の網目は、前記対象物質よりも大きい試料の通過を阻止する大きさである、請求項 1 に記載の定量方法。

【請求項 3】

前記試料が血液であり、前記対象物質が血漿成分である、請求項 1 に記載の定量方法。

【請求項 4】

前記検出ステップでは、前記接触ステップでの前記試料と前記構造体との接触開始時間から所定時間経過後において、前記試料と前記構造体との接触界面から所定距離だけ離れた位置における前記増加または減少する物質の濃度を測定する、請求項 1 に記載の定量方法。

【請求項 5】

前記検出ステップでは、前記試料と前記構造体との接触界面から所定距離だけ離れた位置において、前記増加または減少する物質が所定濃度検出されるまでの時間を、前記接触ステップでの前記試料と前記構造体との接触開始時間に基づく

測定する、請求項1に記載の定量方法。

【請求項6】

前記検出ステップでは、前記接触ステップでの前記試料と前記構造体との接触開始時間から所定時間経過後において、前記増加または減少する物質が検出される位置の、前記試料と前記構造体との接触界面からの距離を測定する、請求項1に記載の定量方法。

【請求項7】

前記検出ステップでは、前記接触ステップ後の構造体をスキャンすることにより、前記増加または減少する物質の前記試料と前記構造体との接触界面からの距離に対する濃度分布を検出する、請求項1に記載の定量方法。

【請求項8】

前記検出ステップでは、前記増加又は減少する物質の吸光度を測定することにより前記増加又は減少する物質を検出する、請求項1に記載の定量方法。

【請求項9】

電荷を有する前記対象物質に電圧を印加することで、前記対象物質の前記構造体中への拡散を促進する拡散促進ステップをさらに含む、請求項1に記載の定量方法。

【請求項10】

三次元網目構造物質で形成され、前記網目に対象物質と反応する試薬が含有されている構造体を有する反応セルと、

前記対象物質と前記試薬との反応により増加又は減少する物質が増加または減少している過程において、前記反応セル内における前記増加又は減少する物質の吸光度を、前記試料と前記構造体との接触界面を基準にして測定するための光入射部及び光受光部と、

前記反応セルに前記対象物質を含む試料を導入する導入管とを含み、

前記構造体の網目は、少なくとも前記対象物質を通過させる、
定量チップ。

【請求項11】

前記構造体の網目は、前記対象物質よりも大きい試料の通過を阻止する大きさ

である、請求項10に記載の定量チップ。

【請求項12】

前記光入射部の光入射面の面方向及び前記光受光部の光受光面の面方向と前記接触界面の面方向とが交差している、請求項10に記載の定量チップ。

【請求項13】

前記光入射部及び光受光部は、それぞれ前記構造体に光を照射するための光入射孔及び前記構造体からの光を受光する光受光孔から形成されている、請求項10に記載の定量チップ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、対象物質の定量方法及び定量チップに関するものである。

【0002】

【従来の技術】

肝臓・胆道系疾患やアルコール性肝障害を診断し、その治療経過を観察するため、肝臓、腎臓、脾臓などで活動している酵素やその生成物を血液中から採取して濃度測定する生化学検査が広く実施されている。例えばイオン選択電極法、酵素法または比色法等の生化学検査により対象物質を検出し、検査を行っている。比色法に基づく生化学検査は、ある特定の物質が特定の波長の光を特異的に吸収する性質を利用して特定物質の濃度を算出する方法である。つまり、光の吸収量と特定の物質の濃度との相関関係を求めた検量線を用い、測定された光の吸収量から特定の物質の濃度を算出する。

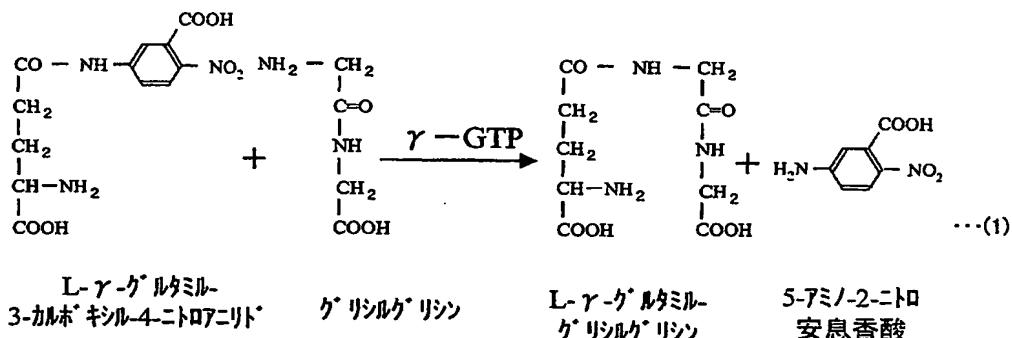
【0003】

アルコール性肝障害を診断する酵素 γ -GTPを、従来の検査装置を用いて検出する方法を以下に説明する。生体から採血を行い、その採血した血液を3000 rpmで10分～15分間遠心分離器にかける。遠心分離された血液は血球成分と血漿成分に分離され、その血漿成分を使用して検査を行う。さらに血漿成分からフィブリノーゲンやプロトロンピンなどの血液凝固因子を取り除いた血清を使用すると良い。より詳細には、以下のように検査を行う。

遠心分離された血漿 $7 \mu\text{L}$ と 64.3 mM の緩衝液グリシルグリシン $200 \mu\text{L}$ をピペットで正確に採取し、光路長 $5 \sim 10 \text{ mm}$ の透明材料でできた反応セルに導入する。導入された血漿と緩衝液とを 37°C 下で均一に混ぜる。5分後、ピペットで正確に採取した 15.4 mM の L- γ -グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアミニド $50 \mu\text{L}$ を、基質液として反応セルにさらに導入し均一に混合する。その後、1.4分間反応させる。このとき、反応式(1)に示すように5-アミノ-2-ニトロ安息香酸が生成される。

【0004】

【化1】



その後、例えば多波長光度計などの比色計を用いて3.6分間にわたって波長 405 nm の光を反応セルに照射し、光の吸収量を $2 \sim 20$ 秒の間隔で測定する。生成物である5-アミノ-2-ニトロ安息香酸を構成しているベンゼン環は、波長 405 nm の光を特異的に吸収する性質がある。よって、光の吸収量を測定することによって5-アミノ-2-ニトロ安息香酸の濃度を検出する。また、5-アミノ-2-ニトロ安息香酸の濃度とそれを生成する酵素 γ -GTPの濃度の間には相関があるため、予め相関関係を求めた検量線を用いて5-アミノ-2-ニトロ安息香酸の濃度から γ -GTPの濃度検出する。このようにして、最終的に血液1Lあたりの γ -GTP活性を算出する。

【0005】

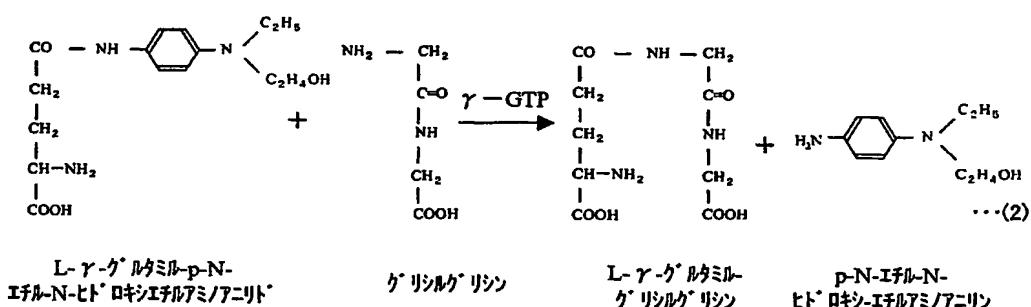
従来の γ -GTP用の超小型の生化学検査チップが非特許文献1に開示されている。図13は、非特許文献1に記載の生化学検査チップである。生化学検査チップは、 2 cm 角の透明材料であるPET(Poly Ethylene Terephthalate)基板

1であり、P E T基板1内には、幅40μm、深さ100μm、長さ1.6mmの測定流路2と参照流路3とが形成されている。

酵素γ-GTPを、上記の生化学検査チップを用いて検出する方法を以下に説明する。まず、緩衝液、12mMのL-γ-グルタミル-p-N-エチル-N-ヒドロキシエチルアミノアニリド及び0.2mMの1-ナフトール-2-スルホン酸カリウムを含む1mLの基質剤を測定流路2および参照流路3に導入し、37℃で3分間加熱する。緩衝液は、グリシルグリシン濃度が50mMの50mMホウ酸緩衝液である。そして、測定流路2のみに遠心分離した0.5μLの血清を導入し、37℃で15分間反応させる。そして、8.8mMの過ヨウ素酸を1.2mL混ぜる。この操作により反応式(2)、(3)に示すように青色色素が生成される。

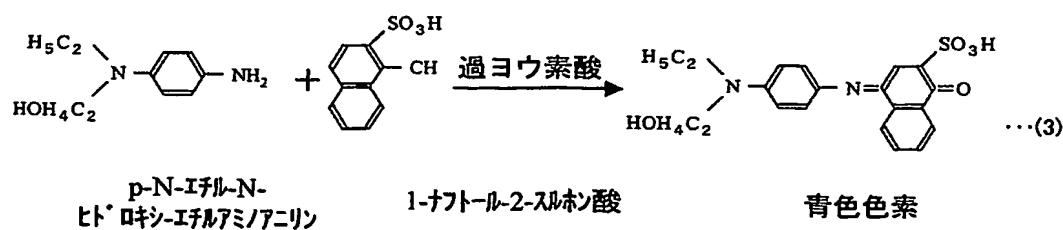
【0006】

【化2】



【0007】

【化3】



直径100μmのピンホールを通して波長660nmの光を測定流路2と参照

流路 3 とに照射し、両者の光の吸収量を比較する。測定流路 2 のみに青色色素が生成しているので測定流路 2 での光の吸収量がより大きくなる。この光の吸収量の増加から γ -GTP の濃度を算出する。

【0008】

【非特許文献 1】

2002 International conference on Solid State Devices and Materials, 328-329, 2002

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

しかし、病院や血液検査センターにおいて生化学検査を行うための検査装置は、大型で非常に高価である。また、検査方法が複雑であるため、専門の臨床検査技師により検査が行われており、検査結果が出るまでには 1 週間以上かかっている。

また、非特許文献 1 に記載の生化学検査チップの測定流路 2 及び参照流路 3 は微細なマイクロ流路であるため、導入される流体の体積に対する表面積の割合が大きくなる。よって、流体に対して表面張力が大きく働き、マイクロ流路内で血清と試薬を均一に混合するのは難しく、血清と試薬の反応を促進することが難しい。

【0010】

さらに、5-アミノ-2-ニトロ安息香酸の濃度を正確に求めるためには、反応セルや生化学検査チップの流路内に存在する溶液を均一にする必要がある。また、従来の試料の定量方法では、前述のように血漿、緩衝液または基質液を、検量線を求めた時と同じ体積量に正確に採取する必要がある。つまり、生成物の量は基質や血漿の量によって変わるため、試料である血漿や血清、基質である L- γ -グルタミル 3-カルボキシ-4-ニトロアニリドの量を、検量線を求めた時と同じ量に正確に採取する必要がある。しかし、微量の血漿や血清を正確に採取するのは難しい。

【0011】

また、比色法において測定物質を光で検出するときは、血球成分つまり赤血球

や白血球などがあると血球による乱反射などの影響により正確な光の透過量を測定することはできない。そこで、採血した血液を遠心分離して血球成分と血漿成分に分離し、血漿成分のみをとりだし試薬と反応させてなければならない。また、反応セルや流路内に注入された試薬が、運送時や使用時に漏洩するという問題がある。さらに、近年超小型の生化学検査チップの開発も活発化してきている。

そこで、本発明は、対象物質の定量を短時間で行うことができる定量方法及び定量チップを提供することを目的とする。

【0012】

また、本発明は、対象物質の定量を簡便化できる定量方法及び定量チップを提供することを目的とする。

また、本発明は、対象物質を正確に定量できる定量方法及び定量チップを提供することを目的とする。

さらに、本発明は、試薬の漏洩を防止できる定量方法及び定量チップを提供することを目的とする。

【0013】

【課題を解決するための手段】

上記の課題を解決するために、本願第1発明は、三次元網目構造の物質で形成され、前記網目に対象物質と反応する試薬が含有されている構造体を用いて前記対象物質を定量する定量方法であって、前記対象物質を含む試料を前記構造体に接触させる接触ステップと、前記対象物質と前記試薬との反応により増加又は減少する物質が増加または減少している過程において、前記構造体内における前記増加又は減少する物質を、前記試料と前記構造体との接触界面を基準にして検出する検出ステップと、前記検出ステップの結果に応じて前記対象物質の定量を行う定量ステップとを含み、前記構造体の網目は、少なくとも前記対象物質を通過させる定量方法を提供する。

【0014】

対象物質を含む試料を三次元網目構造の構造体に接触させることで、対象物質が構造体内を拡散し、構造体の網目に含有された試薬と反応する。つまり、試薬が含有された構造体が対象物質と試薬との反応場となり、この対象物質と試薬と

の反応により増加又は減少する物質をその反応過程において検出し、その検出結果に基づいて対象物質を定量する。このとき、増加又は減少する物質は、試料と構造体との接触界面を基準にして、例えば増加又は減少する物質の接触界面からの拡散距離により検出される。このように、対象物質が構造体内に拡散しながら試薬と反応している過程において増加または減少する物質を定量するので、反応の平衡状態を待たずに対象物質の定量を短時間で行うことができる。また、対象物質の定量は、対象物質が構造体内へ拡散し、拡散した対象物質が試薬と反応することに基づいて行われる。具体的には、対象物質の構造体内への拡散距離と対象物質の濃度とが相関関係を有していることに基づいて対象物質の定量が行われる。そのため、対象物質を含む試薬を正確に計量する必要がなく、対象物質の定量を簡便化することができる。

【0015】

また、対象物質が試薬と特異的に反応することより、対象物質以外の試料を遠心分離等により分離して除去する必要がなく、対象物質の定量を簡便にし、短時間に行うことができる。

本願第2発明は、本願第1発明において、前記構造体の網目は、前記対象物質よりも大きい試料の通過を阻止する大きさである定量方法を提供する。

構造体の網目は、対象物質を通過させ、かつ対象物質よりも大きい試料の通過を阻止する大きさであるので、定量対象である対象物質が網目を拡散し試薬とほぼ均一に反応する。そのため、対象物質を含む試料と試薬とを均一に混合する必要がない。また、反応により増加又は減少する物質の検出が、対象物質よりも大きい試料により阻害されるのを防止することができる。例えば、対象物質よりも大きい試料による乱反射が正確な光の透過量の測定を阻害するのを防止することができる。さらに、試薬は構造体の網目に含有されているため、試薬の漏洩を防ぐことができる。

【0016】

また、対象物質よりも大きい試料が構造体の網目内部へ拡散せず対象物質の定量を阻害しないこと、及び対象物質が試薬と特異的に反応することより、対象物質よりも大きい試料や対象物質以外の試料を遠心分離等により分離して除去する

必要がなく、対象物質の定量を簡便にし、短時間に行うことができる。

本願第3発明は、本願第1発明において、前記試料が血液であり、前記対象物質が血漿成分である定量方法を提供する。

試料である血液を構造体に接触させると、血漿成分が構造体の網目を通過し構造体内の試薬と反応する。このとき、血漿成分よりも大きい試料、例えば血球成分は構造体の網目を通過できないので、比色法により対象物質と試薬との反応により増加又は減少する物質を検出する際に、血球成分による吸収・散乱などの影響が低減する。よって、対象物質の定量を正確に行うことができ、血球分離を行う必要がない。

【0017】

本願第4発明は、本願第1発明において、前記検出ステップでは、前記接触ステップでの前記試料と前記構造体との接触開始時間から所定時間経過後において、前記試料と前記構造体との接触界面から所定距離だけ離れた位置における前記增加または減少する物質の濃度を測定する定量方法を提供する。

定量対象である対象物質が高濃度であるほど構造体内への対象物質の拡散速度が大きいため、対象物質と試料との反応により増加した物質は高濃度で、又は減少した物質は低濃度で検出される。よって、所定時間経過後における接触界面から所定距離での対象物質と試料との反応により増加又は減少する物質の濃度から対象物質の定量を行うことができる。

【0018】

本願第5発明は、本願第1発明において、前記検出ステップでは、前記試料と前記構造体との接触界面から所定距離だけ離れた位置において、前記増加または減少する物質が所定濃度検出されるまでの時間を、前記接触ステップでの前記試料と前記構造体との接触開始時間を基準に測定する定量方法を提供する。

対象物質が高濃度であるほど構造体内への対象物質の拡散速度が大きいため、対象物質と試料との反応により増加又は減少する物質が接触界面からある距離において短時間に検出される。よって、接触界面から所定距離において、増加又は減少する物質が所定濃度検出されるまでの時間から対象物質の定量を行うことができる。

【0019】

本願第6発明は、本願第1発明において、前記検出ステップでは、前記接触ステップでの前記試料と前記構造体との接触開始時間から所定時間経過後において、前記増加または減少する物質が検出される位置の、前記試料と前記構造体との接触界面からの距離を測定する定量方法を提供する。

対象物質が高濃度であるほど構造体内への対象物質の拡散速度が大きいため、対象物質と試料との反応により増加又は減少する物質が検出される検出範囲も大きくなる。よって、所定時間経過後において、増加または減少する物質が検出される位置の距離を測定することで対象物質を定量することができる。

【0020】

本願第7発明は、本願第1発明において、検出ステップでは、前記接触ステップ後の構造体をスキャンすることにより、前記増加または減少する物質の前記試料と前記構造体との接触界面からの距離に対する濃度分布を検出する定量方法を提供する。

対象物質が高濃度であるほど構造体内への対象物質の拡散速度が大きいため、濃度分布の濃度勾配が急峻となる関係にある。よって、増加または減少する物質の濃度分布を検出することで対象物質を定量することができる。

【0021】

本願第8発明は、本願第1発明において、前記検出ステップでは、前記増加又は減少する物質の吸光度を測定することにより前記増加又は減少する物質を検出する定量方法を提供する。

本願第9発明は、本願第1発明において、電荷を有する前記対象物質に電圧を印加することで、前記対象物質の前記構造体中への拡散を促進する拡散促進ステップをさらに含む定量方法を提供する。

電荷を有する対象物質に電圧を印加することで、対象物質を構造体内に高速に拡散することができる。よって、対象物質の定量をさらに短時間で行うことができる。

【0022】

本願第10発明は、三次元網目構造物質で形成され、前記網目に対象物質と反

応する試薬が含有されている構造体を有する反応セルと、前記対象物質と前記試薬との反応により増加又は減少する物質が増加または減少している過程において、前記反応セル内における前記増加又は減少する物質の吸光度を、前記試料と前記構造体との接触界面を基準にして測定するための光入射部及び光受光部と、前記反応セルに前記対象物質を含む試料を導入する導入管とを含み、前記構造体の網目は、少なくとも前記対象物質を通過させる定量チップを提供する。

【0023】

上記の定量チップ内では、対象物質が構造体内を拡散し、構造体の網目に含有された試薬と反応する。つまり、試薬が含有された構造体が対象物質と試薬との反応場となり、この対象物質と試薬との反応により増加又は減少する物質をその反応過程において検出し、その検出結果に基づいて対象物質を定量する。このとき、増加又は減少する物質は、試料と構造体との接触界面を基準にして、例えば増加又は減少する物質の接触界面からの拡散距離により検出される。このように、対象物質が構造体内に拡散しながら試薬と反応している過程において増加または減少する物質を定量するので、反応の平衡状態を待たずに対象物質の定量を短時間で行うことができる。また、対象物質の定量は、その拡散速度に基づいて行うため、対象物質を含む試薬を正確に計量する必要がなく、対象物質の定量を簡便化することができる。

【0024】

導入管を介して対象物質とともに対象物質を含む試料が反応セルに導入される。そのため、対象物質が微量であっても、導入管における流路抵抗を試料全体として小さくし、対象物質を反応セルに容易に導入することができる。

また、三次元網目構造物質で形成された構造体内の網目に試薬が含有されているため、運送時や使用時における試薬の漏洩を防ぐことができる。

さらに、対象物質が試薬と特異的に反応することより、対象物質以外の試料を遠心分離等により分離して除去する必要がなく、対象物質の定量を簡便にし、短時間に行うことができる。

【0025】

本願第11発明は、本願第10発明において、前記構造体の網目は、前記対象

物質よりも大きい試料の通過を阻止する大きさである定量チップを提供する。

構造体の網目は、対象物質を通過させ、かつ対象物質よりも大きい試料の通過を阻止する大きさであるので、定量対象である対象物質が網目を拡散して試薬とほぼ均一に反応する。そのため、対象物質を含む試料と試薬とを均一に混合する必要がない。また、反応により増加又は減少する物質の検出が、対象物質よりも大きい試料により阻害されるのを防止することができる。さらに、対象物質よりも大きい試料が構造体の網目内部へ拡散せず対象物質の定量を阻害しないこと、及び対象物質が試薬と特異的に反応することより、対象物質よりも大きい試料や対象物質以外の試料を遠心分離等により分離して除去する必要がなく、対象物質の定量を簡便にし、短時間に行うことができる。

【0026】

本願第12発明は、本願第10発明において、前記光入射部の光入射面の面方向及び前記光受光部の光受光面の面方向と前記接触界面の面方向とが交差している定量チップを提供する。

本願第13発明は、本願第10発明において、前記光入射部及び光受光部は、それぞれ前記構造体に光を照射するための光入射孔及び前記構造体からの光を受光する光受光孔から形成されている定量チップを提供する。

例えば定量チップの膜厚が薄く吸光度測定のための光路長が十分に確保できない場合、定量チップに設けられた光入射孔及び光受光孔により反応セル内の吸光度を測定することで、十分に光路長を確保し精度良く吸光度を測定することができる。

【0027】

【発明の実施の形態】

<実施形態例>

図1は、本発明の実施形態例に係る定量チップの構成図、図2は図1中 $\alpha - \alpha$ 線を含む断面における平面図、図3(a)は反応セルの拡大図、図3(b)は反応セル、光入射孔及び光受光孔の拡大図、図3(c)は光入射孔の面方向及び光受光孔の面方向と接触界面の面方向との関係を示す説明図である。以下に、実施形態例に係る定量チップの構成について説明する。

[構成]

定量チップ10は、透明樹脂であるP E T基板であり、採血針などの導入口12、導入管14、反応セル16、光入射孔18a、光受光孔18b及び導出口20を有している。反応セル16には、三次元網目構造物質からなる構造体22と、定量対象である対象物質を構造体22と接触させるための接触部24とが設けられている。対象物質が接触部24に導入され、対象物質と構造体22とが接觸している界面、つまり図3（a）中接触界面Aが対象物質の定量を行うための基準位置となる。ここで、光入射孔18aの光が入射する光入射面（図3（b）中 β 面）の面方向及び光受光孔18bの光を受光する光受光面（図3（b）中 γ 面）の面方向は、接觸界面Aの面方向と交差する。図3（c）を用いてより詳細に説明する。図3（c）は、反応セル16における接觸界面A、光入射孔18aの光入射面 β 及び光受光孔18bの光受光面 γ の関係図である。図3（c）に示すように、光入射面 β の面方向及び光受光面 γ の面方向は、接觸界面Aを延長した面方向と交差するように光入射孔18a及び光受光孔18bが設けられる。

【0028】

上述の通り、光入射孔18a及び光受光孔18bは、構造体22内の吸光度等を測定可能なように接觸界面Aの面方向に交差して設けられていれば良く、その位置・形状・大きさは限定されない。例えば、接觸界面Aの面方向に交差するように構造体22に対して部分的に光入射孔18a及び光受光孔18bが設けられても良い。さらに、光入射孔18a及び光受光孔18bの代わりに光透過材料から形成されている定量チップ10の主面及び主面と対向する裏面を、それぞれ光入射用及び光受光用の透光部として用いても良い。このとき、透光部は、透光部の光入射面の面方向及び光受光面の面方向が、上述の光入射孔18a及び光受光孔18bと同様に、構造体22内の吸光度を測定可能なように接觸界面Aの面方向に交差して設けられていれば良く、その位置・形状・大きさは限定されない。よって、例えば定量チップ10全体が光透過材料で形成されている必要はなく、構造体22の22内の吸光度を測定可能なように部分的に光透過材料で形成され、光透過材料で形成された部分を透光部として使用できるような構成でも良い。

【0029】

上記のように定量チップ10に光入射孔18a及び光受光孔18bを設けるか、あるいは定量チップ10の正面及び裏面を透光部として用いるかは、例えば構造体22内を透過する光の光路長に応じて適宜選択可能である。例えば、構造体22の膜厚、つまり図3(a)中膜厚Wが5mmから1cm以下である場合は、光入射孔18a及び光受光孔18bにより吸光度を測定すると好ましい。膜厚Wが薄い場合、構造体22内を透過する光の光路長を十分に確保できない場合がある。よって、光入射孔18a及び光受光孔18bにより構造体22内の吸光度を測定することで、十分に光路長を確保し精度良く吸光度を測定することができる。また、膜厚Wが薄い場合、構造体22内の容積が小さいため、構造体22内に導入する対象物質を少量準備するだけで定量ができる。

【0030】

対象物質が導入される接触部24は、光入射孔18a及び光受光孔18bを介して対象物質が定量可能なように設けられていれば良く、その位置・形状・大きさは限定されない。

接触界面Aと交差する方向の構造体22の長さ、つまり図3(a)中長さTは、構造体22を形成するゲル材料や対象物質の拡散のし易さ等に応じて適宜設定可能である。

構造体22は、例えばアガロース等のゲル状物質を主体として構成されており、対象物質と反応する試薬を含有している。アガロースは多糖類のゲル状物質で、寒天の主成分でもあり、生体物質との適合性が良く、透明性が高い。また、アガロースの網目は、少なくとも対象物質を通過させる大きさに調整されている。さらに、対象物質よりも大きい物質を通過させない大きさに調整されていると好ましく、例えば数十nmから数百nmに設定されている。このようにゲル状物質の網目の大きさを調整することで、試料として血液を採取した場合に、定量対象である血漿成分よりも大きな径の血球成分の構造体22内部への拡散を阻害する等の機能を持たせることができる。

[定量方法]

次に、上記の定量チップ10を用いた定量方法について説明を行う。定量チッ

プロの導入口12から対象物質を含む試料を導入管14に導入する。導出口20から対象物質を含む試料を吸引することで、反応セル16内の接触部24に対象物質を含む試料を導入し、構造体22と対象物質を含む試料とを接触させる。構造体22の網目は少なくとも対象物質を通過させる大きさであるので、試料中の少なくとも対象物質が構造体22の表面から内部へ拡散する。このとき、対象物質以外の試料でかつ構造体22の網目よりも小さな物質は、構造体22内部へ拡散するが、試薬が有する反応の特異性により試薬とは反応しない。一方、構造体22内部へ拡散した対象物質は、構造体22内に含有された試薬と特異的に反応する。この対象物質と試薬との反応に消費された物質、または対象物質と試薬との反応により生成した物質を、試料と構造体22との接触界面を基準にして検出することにより対象物質の定量を行う。特に、対象物質の定量は、対象物質が構造体22内に拡散しながら試薬と反応している過程において行われる。なお、対象物質と構造体22との接触界面は、その大きさ、形状等は限定されない。

【0031】

対象物質と試薬との反応に消費された物質、または対象物質と試薬との反応により生成した物質の検出は、光入射孔18aにより構造体22に光を入射し、光受光孔18bにより構造体22から出射される光を受光することにより行われる。具体的には、例えば図4に示す検出装置30を用いて行われる。検出装置30は、例えば発光部32a、受光部32b、スイッチパネル34及び表示部36を有している。定量チップ10に設けられた光入射孔18a及び光受光孔18bを、検出装置30の発光部32a及び受光部32bそれぞれに挿入し、構造体22内の吸光度を測定する。吸光度の測定は、透過光測定、反射光測定等の方法により行うことができる。

【0032】

ここで、対象物質が電荷を有している場合、対象物質を含む試料が導入された反応セル16に電圧を印加し、対象物質を構造体22中に拡散させるようにしても良い。このようにすることで、対象物質を構造体22内に高速に拡散することができ、対象物質の定量をさらに短時間で行うことができる。

前述したように、構造体22の網目が対象物質よりも大きい物質を通過させな

い大きさに調整されている場合には、試料に含まれる物質でゲルの網目の大きさよりも大きい物質は、構造体22の網目の大きさによる制限を受け、その網目を通過することができない。よって、対象物質よりも大きい試料の通過が阻止されつつ、少なくとも定量対象である対象物質が網目を拡散し試薬とほぼ均一に反応する。そのため、対象物質を含む試料と試薬とを均一に混合する必要がない。例えば、対象物質が血液中の血漿成分である場合でも、血液中の血球成分は構造体22内を拡散せず血漿成分が構造体22内を拡散するため、血漿成分を血液中から分離する必要がない。さらに、反応により増加又は減少する物質の検出が、対象物質よりも大きい試料により阻害されるのを防止することができる。例えば、血球成分による乱反射が正確な光の透過量の測定を阻害するのを防止することができる。

【0033】

以下に、対象物質の定量方法について詳述する。以下に示す方法では、試料中の対象物質の濃度に比例して対象物質の構造体22への拡散速度が増加することに基づいて予め検量線を算出し、その検量線に基づいて対象物質の定量を行っている。

第1の方法においては、図5に示すように、対象物質を含む試料と構造体22との接触が開始された接触開始時間 ($t = t_0$) から所定時間経過後 ($t = t_0 + \Delta t_1$) において、対象物質と試薬との反応に消費された物質Mの濃度D、または対象物質と試薬との反応により生成した物質Mの濃度Dを測定する。濃度Dの検出地点Bは、試料と構造体22との接触界面Aから所定距離Lの地点である。定量対象である対象物質が高濃度であるほど構造体22内への対象物質の拡散速度が大きいため、対象物質と試薬との反応により増加した物質は高濃度で、又は減少した物質は低濃度で検出される。濃度の検出ではなく、吸光度を検出しても良い。これらの接触開始からの時間、接触界面Aからの距離L及びその検出地点Bでの増加又は減少した物質の濃度に基づいて、試料中の対象物質の濃度を定量することができる。

【0034】

第2の方法においては、図6に示すように、対象物質を含む試料と構造体22

との接触界面Aから所定距離Lの検出地点Bにおいて、対象物質と試薬との反応により増加した物質Mまたは対象物質と試薬との反応により減少した物質Mが所定濃度D検出されるまでの時間 (Δt_x) を測定する。このとき、測定時間 (Δt_x) は、試料と構造体22との接触開始時間 ($t = t_0$) を基準に測定する。対象物質が高濃度であるほど構造体22への対象物質の拡散速度が大きいため、対象物質と試薬との反応により増加した物質又は減少した物質が検出地点Bで所定濃度検出されるまでの時間が短い。よって、接触界面Aからの距離、及びその検出地点Bの増加又は減少した物質が所定濃度検出されるまでの接触開始からの時間に基づいて対象物質の定量を行うことができる。

【0035】

第3の方法においては、図7に示すように、試料と構造体22との接触開始時間 ($t = t_0$) から所定時間の経過後 ($t = t_0 + \Delta t_1$) において、対象物質と試薬との反応により増加した物質Mまたは減少した物質Mが検出される最終地点Cを検出し、その最終地点Cの接触界面Aからの検出距離Eを測定する。対象物質が高濃度であるほど構造体22への対象物質の拡散速度が大きいため、対象物質と試薬との反応により増加した物質又は減少した物質が検出される最終地点Cの、接触界面Aからの検出距離Eも大きくなる。よって、接触開始から所定時間経過後において、増加又は減少した物質が検出される地点の接触界面Aからの検出距離Eを測定することで対象物質を定量することができる。

【0036】

第4の方法においては、図8(a)に示すように、試料と構造体22との接触開始時間 ($t = t_0$) から所定時間経過後 ($t = t_0 + \Delta t_1$) の構造体22をスキャンし、対象物質と試薬との反応により増加した物質または減少した物質の濃度分布のプロファイルを抽出する。そして、スキャンされたプロファイルに該当する増加または減少する物質の濃度分布を検出し、対象物質を定量する。また、図8(b)に示すようにスキャンして得られたプロファイルより、距離と濃度との関係を求めてても良い。具体的には、対象物質と試薬との反応により増加した物質または減少した物質の、試料と構造体22との接触界面Aからの距離Lに対する濃度分布を検出する。対象物質が高濃度であるほど構造体22への対象物質の

拡散速度が大きいため、濃度分布の濃度勾配が急峻となる関係にある。よって、増加または減少する物質の濃度分布を検出することで対象物質を定量することができる。

【0037】

上記のように、本実施形態例における対象物質の定量は、対象物質が構造体2内に拡散しながら試薬と反応している過程において行われるが、対象物質の拡散が終了し、試薬との反応が終了した後であっても定量を行うことができるのは言うまでもない。

[生化学検査項目]

本発明では、例えば以下のような生化学検査を行うこともできる。

肝機能を検査する項目：乳酸脱水素酵素（LDH）、AST（GOT）、ALT（GPT）、アルカリ性ホスファ（ALP）、ビリルビン（Bil）、総ビリルビン（TBil）、 γ -GTP、コリンエステラーゼ（ChE）、アルブミン・グロブリン比（A/G比）、LAP、ICG、ZTT、TTTなど。

【0038】

腎機能を検査する項目：尿素窒素（BUN）、クレアチニン（Cr）、尿酸（UA）など。

心臓を検査する項目：CPK、LDH、AST（GOT）など。

脂質を検査する項目：総コレステロール（TC）、HDLコレステロール（HDL-C）、LDLコレステロール（LDL-C）、トリグリセライド（TG）、遊離コレステロール（FC）など。

肝臓を検査する項目：アミラーゼ（AMY）、リパーゼなど。

【0039】

糖代謝一糖尿病を検査する項目；グルコース、グリコヘモグロビン（HbA1c）、インスリンなど。

[ゲル状物質の種類]

本発明では、例えば以下のようなゲル状物質を採用することもできる。

天然高分子ゲル（寒天、アガロペクチン、デンプン、アミロース、アミロペクチン、カラギーナン、ジェランガム、キタンサンガム、カードラン、ゼラチン、コ

ラーゲン、アルギニン酸、ペクチン、コンニャクマンナン、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、デキストラン）、合成高分子ゲル（ポリエチレン、ポリスチレン、ポリアクリレート、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸、ポリグルタミン酸、ポリビニルピリジン、ポリビニルイミダゾール、アクリルアミド、ビニルピロリドン、メタクリル酸ヒドロキシエチル、0-ベンジル-L-グルタメート、ポリエチレングリコール、ヒアルロン酸）、無機材料（多孔質ガラスピーズ、シリカゲル）、ラテックスビーズ、ビーズ状高分子ゲル（セファデックス、セファクリル、セファロース、バイオゲル）などである。

【0040】

特に、定量する対象物質がタンパク質からなる酵素である場合、タンパク質が電荷を有していることから、側鎖にイオン性の官能基を有しないゲル状物質であると好ましい。疎水性を示さないゲル状物質であるとさらに好ましい。例えば、アガロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、セルロースまたはアクリルアミド等、これらの誘導体、あるいはこれらのビーズ状高分子ゲルが挙げられる。

[効果]

本発明の定量チップ10では、試薬が含有された構造体22が対象物質と試薬との反応場となり、この対象物質と試薬との反応により増加又は減少する物質をその反応過程において検出し、その検出結果に基づいて対象物質を定量する。つまり、対象物質が構造体22内に拡散しながら試薬と反応している過程において増加または減少する物質を定量するので、反応の平衡状態を待たずに対象物質の定量を短時間で行うことができる。また、対象物質の定量は、構造体22内へ拡散した対象物質が試薬と反応することに基づいて行われるため、対象物質や対象物質を含む試料を正確に採取する必要がない。よって、対象物質の定量を簡便化することができる。つまり、本発明では、対象物質の濃度と拡散速度との関係により予め算出した検量線を用い対象物質の濃度の定量するため、対象物質やその試料の採取を正確にする必要がない。よって例えば、対象物質または対象物質を含む試料が微少量であり、正確な採取が困難な場合であっても対象物質の定量を正確に行うことができる。

【0041】

また、対象物質が試薬と特異的に反応することより、対象物質以外の試料を遠心分離等により分離して除去する必要がなく、対象物質の定量を簡便にし、短時間に行うことができる。さらに、構造体22の網目が、対象物質よりも大きい試料が構造体22の網目内部へ拡散するのを阻害する場合、対象物質よりも大きい試料を遠心分離等により分離して除去する必要がなく、さらに対象物質の定量を簡便にし、短時間に行うことができる。

さらに、導入管14を介して対象物質とともに対象物質を含む試料を反応セル16に導入する。よって、対象物質が微量であっても、導入管14における流路抵抗を試料全体として小さくし、対象物質を反応セル16に容易に導入することができる。

【0042】

また、三次元網目構造物質で形成された構造体22内の網目に試薬が含有されているため、運送時や使用時における試薬の漏洩を防ぐことができる。

さらに、定量チップ10に設けられた光入射孔18a及び光受光孔18bを通して反応セル16内の吸光度を測定し、対象物質の定量を行うため、対象物質の定量チップ10を小型化・軽量化することができる。また、ゲル形成物質が安価であり、少量でゲル状試薬を生成できる。さらに、小型の定量チップに必要なゲル状試薬は少量であるため、定量チップを安価に提供することができるため、自宅で簡便に検査を行うことができる。

<実験例1>

前記実施形態例に示す定量チップ10を用いて、肝機能不全や心筋の健康マークーである乳酸脱水素酵素（LDH）を対象物質として定量を行った。構造体22は、アガロースを使用した。また、アガロースにより形成された構造体22の網目には、LDHを検出するための試薬であるピルビン酸とNADH（還元型ニコチンアミドアデニジヌクレオチド）を含有した。以下に、その網目に基質剤および緩衝液を含む試薬を含有した構造体22の調整方法を説明する。

[構造体の調整方法]

粉末状アガロースが吸湿している可能性があるので、真空乾燥機で数分間乾燥

した。50mgの粉末状アガロースを薬さじ、ピンセット、電子天秤を用いて秤量しサンプル瓶にとった。後に約90℃まで温度上昇するのでサンプル瓶は耐圧性のあるものを用いるのが好ましい。予め純水やTAE緩衝液 (trisacetate et hydroxylamine tetraacetic acid disodium salt solution) などで濃度を調整しておいた試薬溶液10mLをピペットでとり、先のサンプル瓶に添加した。LDHを検出するため、試薬溶液は、pH7に調製した10mMのHEPES緩衝液を用い、ビルビン酸が5μM、NADHが0.1mMになるように混合している。

【0043】

次にマグネットイックスターラを入れて密閉した。30秒程度攪拌し、粉末と純水をなじませた。熱浴に水をはり、温度を90℃に設定した。サンプル瓶を熱浴に入れ、均一な溶液ができるまでスターラで60分以上攪拌した。透明性を得るために65℃で1~12時間攪拌しながら試薬溶液を入れた。攪拌に伴い気泡がゲル中にできるので、サンプル瓶を数秒間超音波処理して気泡を抜いた。冷めてゲルになる前に幅5mm、高さ5mm、厚み0.05mmの反応セルに1.25μL入れた。ゲルが安定な網目構造を作るまで2時間以上待った。

[検出方法]

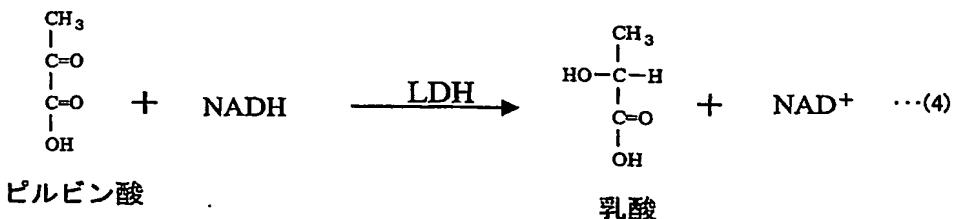
構造体22内の試薬に対し37℃で3分間加熱を行った後、採取した血液を構造体22を有する反応セル16に導入した。導入管14内の血液を導出口20からポンプで外部へ引き出すことによって、導入口12で採血された血液を遠心分離せずに反応セル16に導入した。

【0044】

血液を導入した後、37℃で10分間加熱を行いつつ、血液中に含まれるLDHをアガロースにより形成された構造体22内に拡散させた。LDHの構造体22の拡散に従い、構造体22内に含有された試薬とLDHとが反応式(4)に示すように反応する。

【0045】

【化4】



LDHと構造体22との接触開始時間から所定時間経過後において、LDH及び試薬の反応により消費されるNADHの反応量との濃度を検出した。濃度の検出は次のように行った。定量チップ10内に設けた光入射孔18aに光源を挿入し、NADHが特異的に吸収する波長340nmの光を構造体22の1mm×3mmの領域に界面に沿って入射した。そして、光受光孔18bに挿入した受光素子で受光し、NADH濃度を検知した。

【0046】

NADHはLDHによる反応により消費されるため、LDHの濃度と反応物NADHの濃度との間には相関関係がある。また、構造体22の表面のLDHの濃度、つまり反応セル16に導入されるLDHの濃度が高いほど、LDHの構造体22への拡散速度が大きい。よって、検出したNADHの濃度により、アガロース表面つまり血液中のLDHの濃度を予め算出した検量線に基づいて定量する。ここで、検量線は既知の濃度のLDHを含む試料を用い、上記と同様の方法により調整した構造体22を用い、同様の定量手順により算出した。

[実験結果]

図9は、上述の方法によりアガロースから形成された構造体22に、3種類の濃度のLDHを拡散させた場合に測定されたNADHの吸光度の結果である。時間の経過とともにNADHの吸光度が減少している。図9の実験結果より1、2分の数分の実験によってもNADHの変化を感度良く測定し、所定時間経過後の吸光度からLDHの濃度が定量できた。

【0047】

また、本実施例では採血した血液は遠心分離せずに反応セル16に導入した。

本実施例では、数十nmから数百nmの網目をもつゲル状物質内において、酵素であるLDHを反応させている。よって、直径7μmの赤血球や直径15μmの白血球などはゲル状物質に浸入できず、網目より小さいLDHがゲル状物質に浸入できる。つまり、ゲル状物質は血球のふるい（フィルター）の機能を有しており遠心分離を行う必要がない。このように、ゲル状物質は、酵素との反応場や光を検出する場を与えるだけでなく、血球分離器としての役割も果たす。さらに、酵素と反応すべき試薬の保持体としての役割も果たす。

＜実験例2＞

前記実施形態例に示す構造体22に対象物質を接触させた場合の拡散距離について実験を行い、構造体22が要求する長さTを求めた。ここで、長さTとは、構造体22と対象物質との接触界面Aと交差する方向の構造体22の長さである。

【0048】

図10は拡散距離を測定するための反応セルである。反応セル16は、1mm×12mmの光入射孔18a及び光受光孔18bを有している。反応セル16には、構造体22と接触部24とが設けられている。構造体22は、1%アガロースゲルを用いた。この反応セル16の接触部24に色素であるアシッドレッドを導入し、1%アガロースゲルである構造体22に接触させた。

図11は、アシッドレッド0.4 mM、0.8 mM、1.0 mM、4.0 mMにおける、定量時間と吸光度との関係を示している。図11より定量開始後約5分で、各濃度における吸光度に差異が表れた。よって、定量開始後5分が経過すれば、その時点の吸光度により対象物質であるアシッドレッドの濃度を定量することができる。

【0049】

図12は、アシッドレッド0.08 mM、0.4 mM、0.8 mM、2.0 mM、4.0 mMにおける、定量時間とアシッドレッドの構造体22内の拡散距離との関係を示している。図12より次の結果を得た。

- ・定量開始から5分経過後の全濃度における拡散距離は、約1.5 mm以下。
- ・定量開始から5分経過後のアシッドレッド0.08 mMにおける拡散距離は約

0. 1 mm。

・定量開始から 5 分経過後のアシッドレッド 4. 0 mMにおける拡散距離は約 1 . 0 mm。

・定量開始から 60 分経過後の全濃度における拡散距離は約 5. 0 mm以下

構造体 22 の長さ T が測定時点における対象物質の拡散距離よりも大きく形成されている必要があることを考慮し、構造体 22 の長さ T は次のように決定された。5 分経過後の全濃度における拡散距離は約 1. 5 mm以下であったので、構造体 22 のゲル材料として 1 % アガロースゲルを用い、定量時間が約 5 分である場合、構造体 22 の長さ T が $T = 2. 0 \text{ mm}$ 程度あれば、長さ T がアシッドレッドの拡散距離を測定するのに十分な厚みを有しているため、対象物質であるアシッドレッドを定量できる。また、60 分経過後の全濃度における拡散距離は約 5 . 0 mm以下であったので、構造体 22 の長さ T が最大 $T = 5. 0 \text{ mm}$ 程度あれば定量できる。

【0050】

さらに、比較的濃度の高いアシッドレッド 4. 0 mMにおける定量開始から 5 分経過後の拡散距離は約 1. 0 mm であったので、対象物質が高濃度の場合は構造体 22 の長さ T が少なくとも $T = 1. 0 \text{ mm}$ 程度であれば定量できる。また、比較的濃度の低いアシッドレッド 0. 08 mMにおける定量開始から 5 経過後の拡散距離は約 0. 1 mm であったので、対象物質が低濃度の場合は構造体 22 の長さ T が少なくとも $T = 0. 1 \text{ mm}$ 程度であれば定量できる。

以上より、上記の実験条件下の構造体 22 の長さ T は、0. 1 mm以上 5. 0 mm以下が好ましく、1. 0 mm以上 2. 0 mm以下であるとさらに好ましいという結果が得られた。

【0051】

【発明の効果】

本発明を用いれば、対象物質の定量を短時間で行うことができる定量方法及び定量チップを提供することができる。

また、本発明を用いれば、対象物質の定量を簡便化できる定量方法及び定量チップを提供することができる。

また、本発明を用いれば、対象物質を正確に定量できる定量方法及び定量チップを提供することができる。

【0052】

さらに、本発明を用いれば、試薬の漏洩を防止できる定量方法及び定量チップを提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

本発明の実施形態例に係る定量チップの構成図。

【図2】

図1中 $\alpha - \alpha$ 線を含む断面における平面図。

【図3】

- (a) 反応セルの拡大図。
- (b) 反応セル、光入射孔及び光受光孔の拡大図。
- (c) 光入射孔及び光受光孔と接触界面との関係を示す説明図。

【図4】

検出装置の外観図。

【図5】

定量方法を示す説明図(1)。

【図6】

定量方法を示す説明図(2)。

【図7】

定量方法を示す説明図(3)。

【図8】

- (a) 定量方法を示す説明図(4)。
- (b) 定量方法を示す説明図(5)。

【図9】

実験結果から得られた時間と吸光度との関係。

【図10】

拡散距離を測定するための反応セル。

【図11】

各濃度のアシッドレッドにおける、定量時間と吸光度との関係。

【図12】

定量時間とアシッドレッドの構造体内での拡散距離との関係。

【図13】

非特許文献1に記載の生化学検査チップ。

【符号の説明】

2：測定流路

3：参照流路

10：定量チップ

12：導入口

14：導入管

16：反応セル

18a：光入射孔

18b：光受光孔

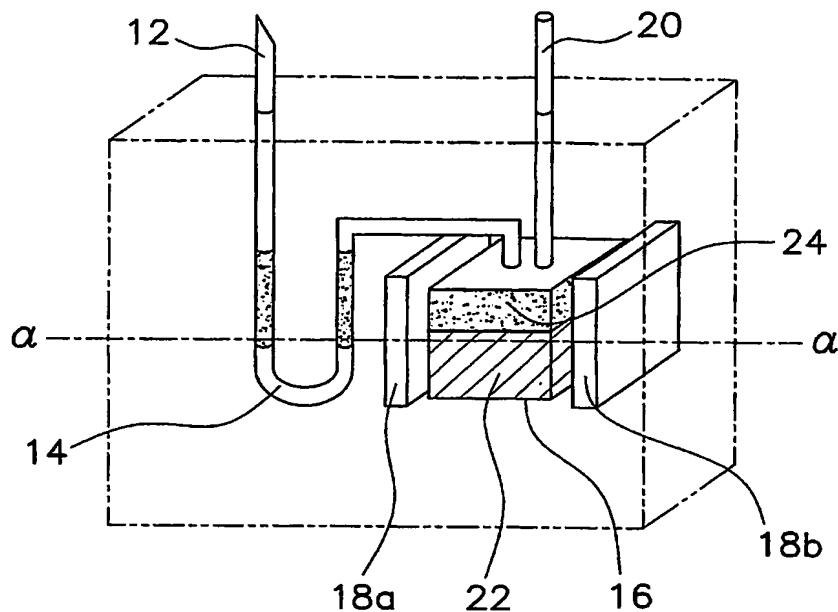
20：導出口

22：構造体

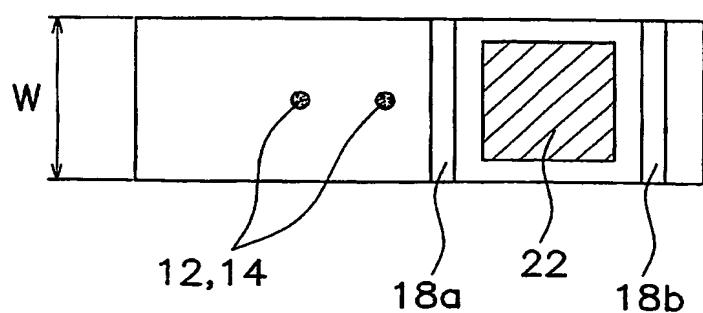
24：接触部

【書類名】 図面

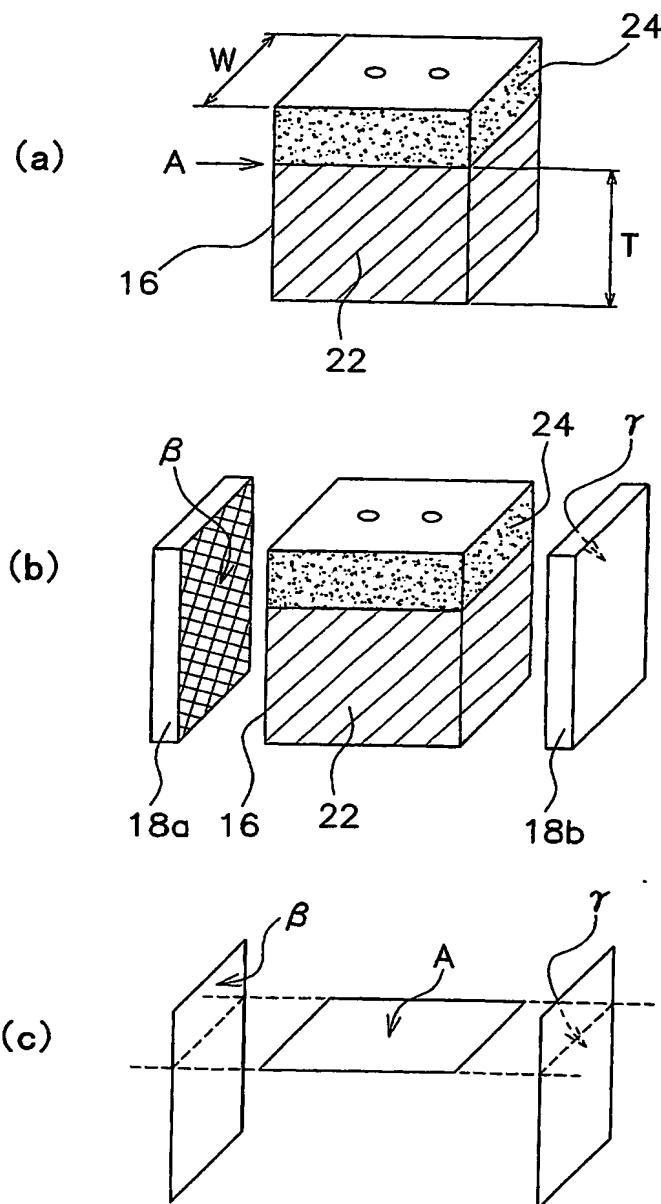
【図1】



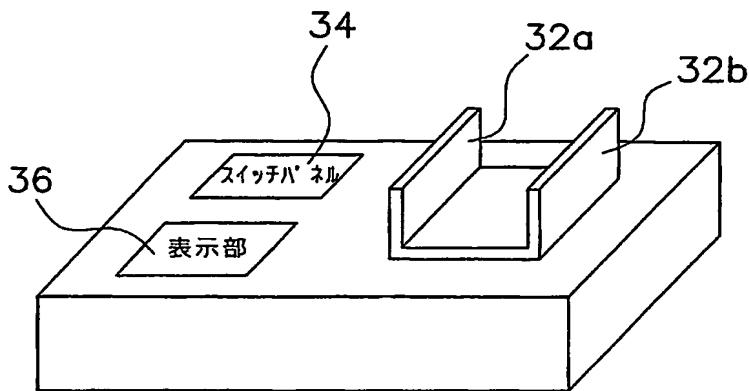
【図2】



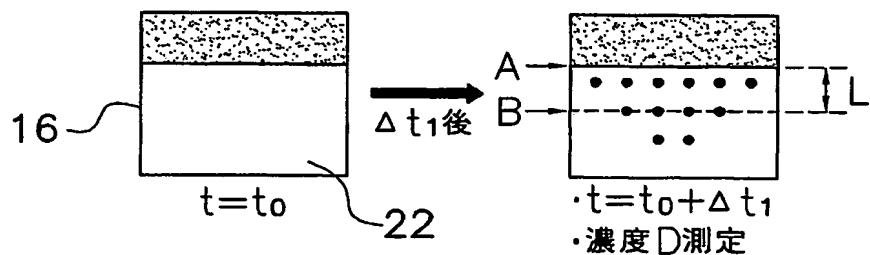
【図3】



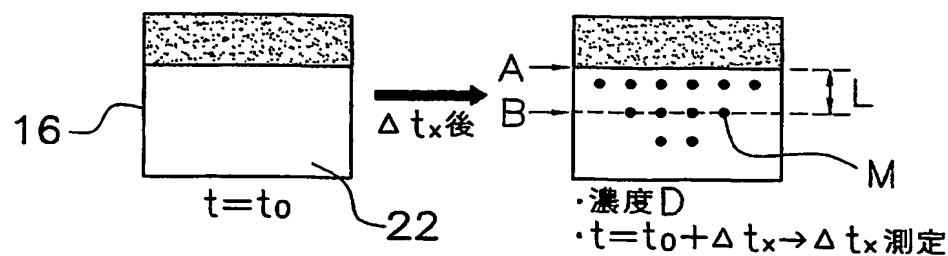
【図4】

30

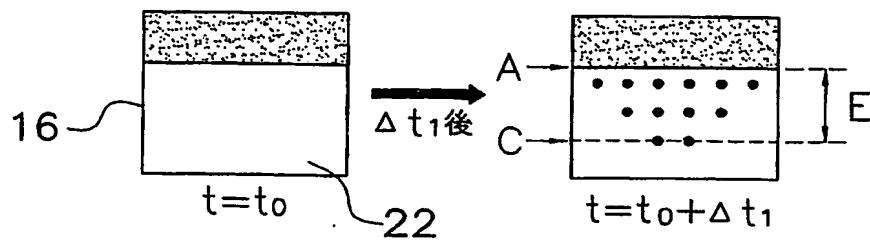
【図5】



【図6】

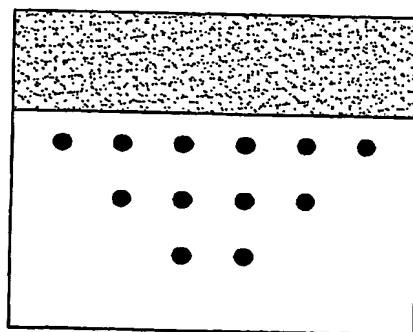


【図7】



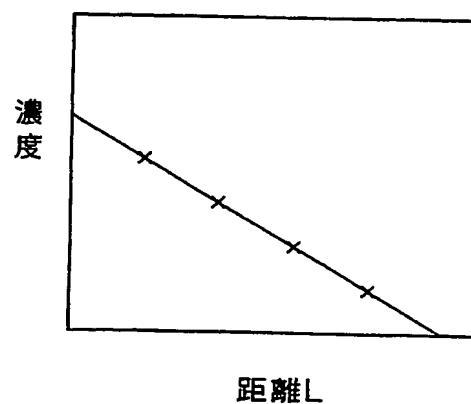
【図8】

(a)

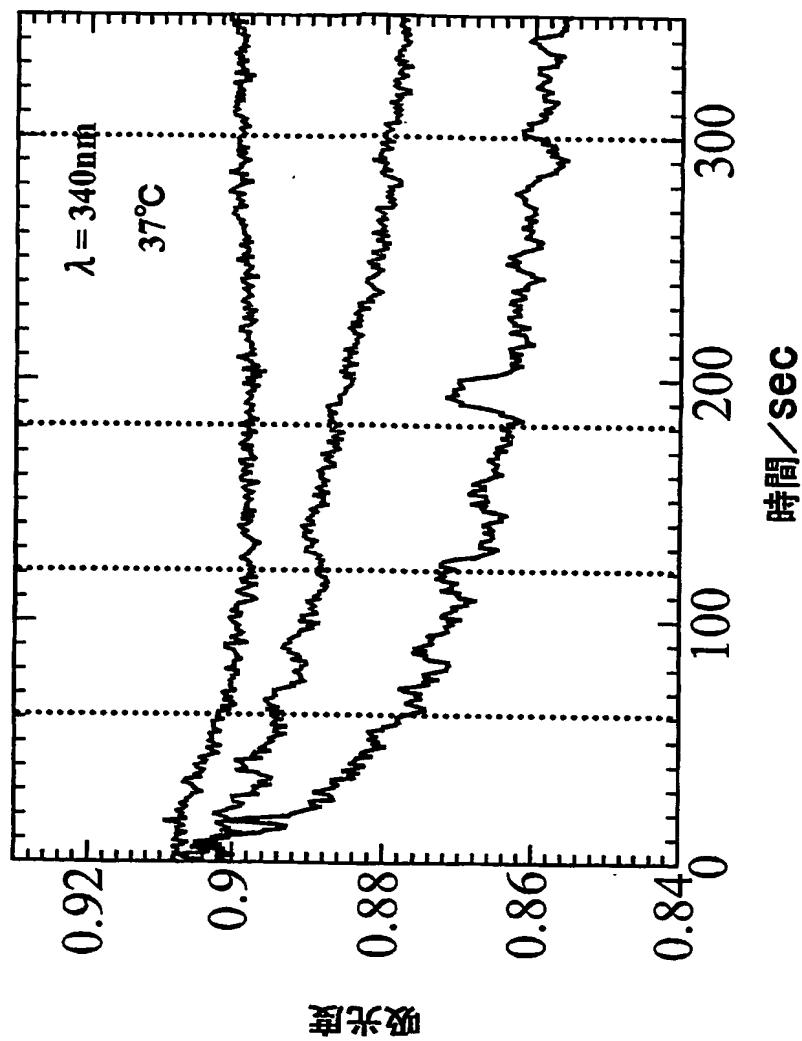


$$t = t_0 + \Delta t_1$$

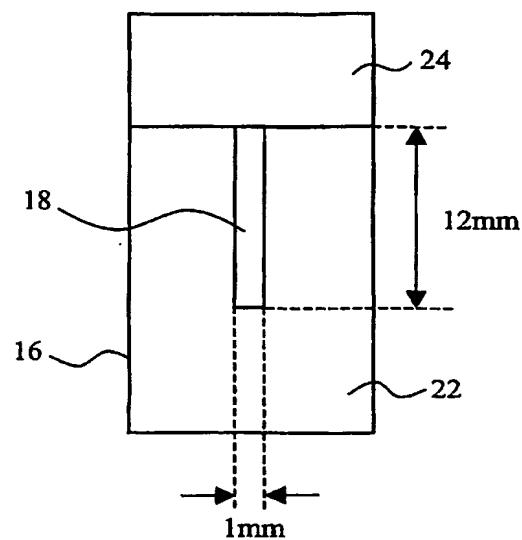
(b)



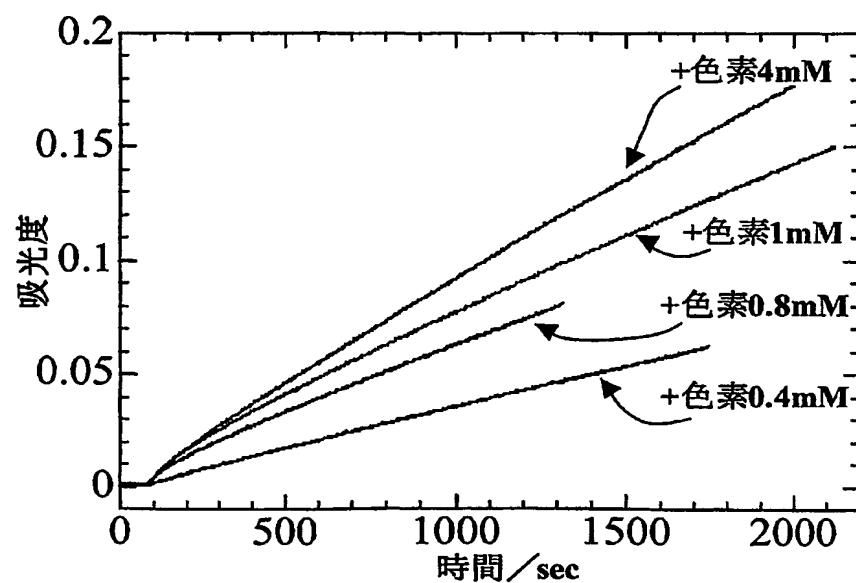
【図9】



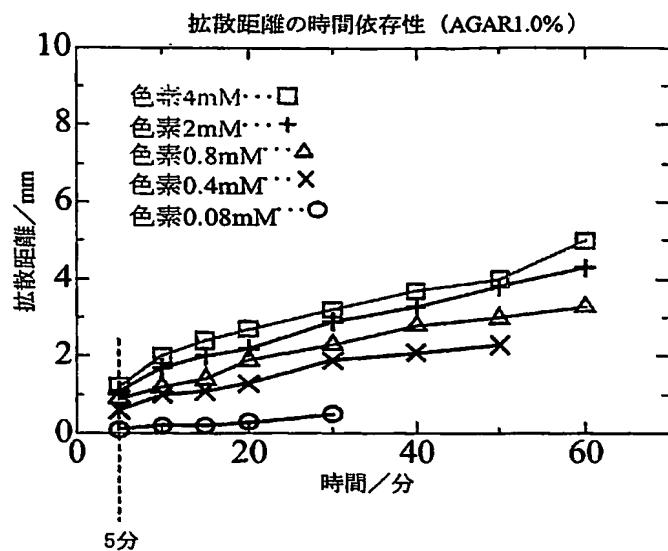
【図 10】



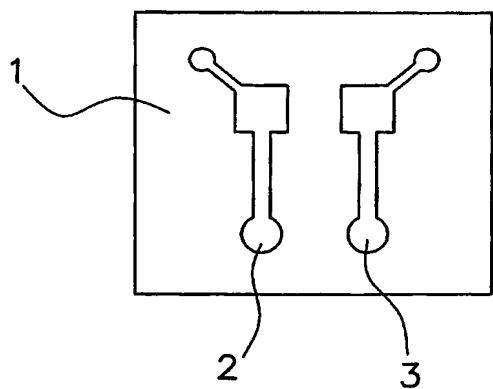
【図 11】



【図12】



【図13】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明は、対象物質の定量を短時間で行うことができる定量方法を提供することを目的とする。

【解決手段】 三次元網目構造物質で形成され、前記網目に対象物質と反応する試薬が含有されている構造体を用いて前記対象物質を定量する定量方法であって、前記対象物質を含む試料を前記構造体に接触させる接触ステップと、前記対象物質と前記試薬との反応により増加又は減少する物質が増加または減少している課程において、前記構造体内における前記増加又は減少する物質を、前記試料と前記構造体との接触界面を基準にして検出する検出ステップと、前記検出ステップの結果に応じて前記対象物質の定量を行う定量ステップとを含み、前記構造体の網目は、少なくとも前記対象物質を通過させる定量方法を提供する。

【選択図】 図 5

特願 2003-167792

出願人履歴情報

識別番号 [000116024]

1. 変更年月日
[変更理由]

1990年 8月22日

新規登録

住所
氏名
京都府京都市右京区西院溝崎町21番地
ローム株式会社